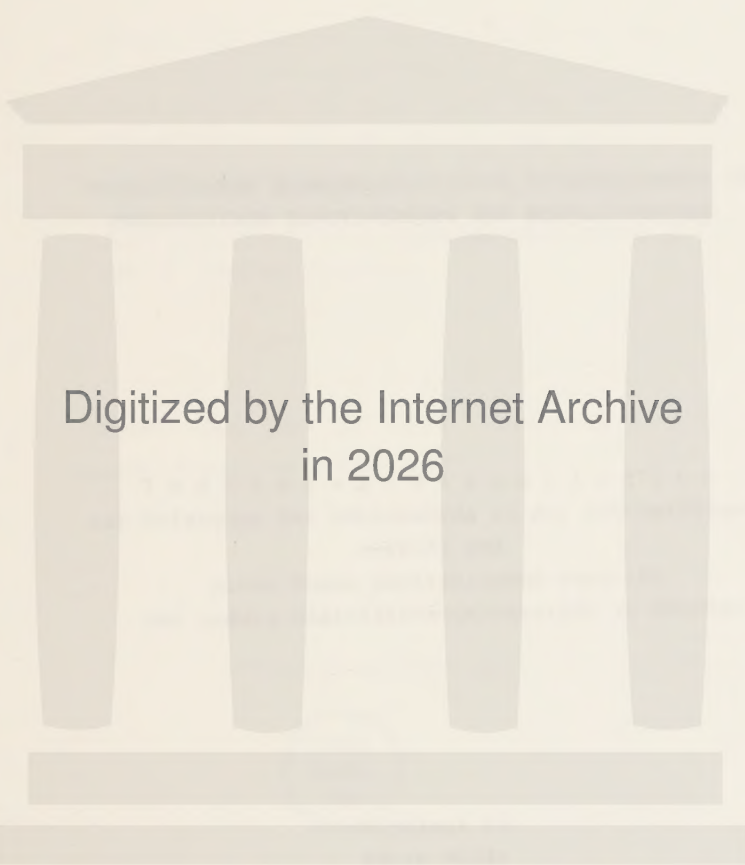


**VERGLEICHENDE
ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN MENSCHLICHEM PAROTISSEKRET
VON NORMALPERSONEN**

Edith Hundt

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Kranke
der Universität München

Direktor: Professor Dr. med. H.H. Naumann

VERGLEICHENDE ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN
MENSCHLICHEM PAROTISSEKRET VON NORMALPERSONEN.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Edith Hundt
aus
München

München 1975

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.H. Naumann
Priv.-Doz. Dr. med. M. Münzel
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.2.1976



Herrn Prof. Dr. H.H. Naumann danke ich für
die guten Arbeitsbedingungen.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Priv.-Doz.

Dr. M. Münzel für die Überlassung des
Themas und sein Interesse an der Arbeit.

Für seine Hilfe und die gute Zusammenar-
beit möchte ich mich besonders bei Herrn
Dr. H. Eichner bedanken.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A)	Einleitung	Seite	1
B)	Theoretische Grundlagen		3
	I) Gesamteiweißbestimmung		3
	II) Eindimensionale Immunelektrophorese nach SCHEIDEGGER		3
	III) Zweidimensionale Immunelektrophorese nach LAURELL		6
	IV) Diskelektrophorese		7
	V) Immundiffusion nach OUCHTERLONY		9
	VI) Immunisierung der Kaninchen gegen menschliches Parotissekret		10
C)	Praktische Ausführung		12
	I) Speichelgewinnung und Modifizierung		12
	II) Immunisierung der Kaninchen gegen menschliches Parotissekret		13
	III) Gesamtproteinbestimmung		14
	1) Methode		14
	2) Ergebnisse		14
	3) Diskussion		15
	IV) Eindimensionale Immunelektrophorese		17
	1) Methode		17
	2) Ergebnisse		20
	a) Immunelektrophorese gegen Antihumanserum		20
	b) Immunelektrophorese gegen Parotissekret-Antiserum vom Kaninchen		21
	3) Diskussion		24
	a) Immunelektrophorese gegen Antihumanserum		24
	b) Immunelektrophorese gegen Parotis-Antiserum vom Kaninchen		24

V)	Zweidimensionale Immunelektrophorese	Seite 26
1)	Methode	26
2)	Ergebnisse	28
a)	Zweidimensionale Immunelektrophorese gegen Antihumanserum	28
b)	Zweidimensionale Immunelektrophorese gegen Parotissekret-Antiserum vom Kaninchen	29
3)	Diskussion	31
a)	Zweidimensionale Immunelektrophorese gegen Antihumanserum	31
b)	Zweidimensionale Immunelektrophorese gegen Parotissekret-Antiserum vom Kaninchen	31
VI)	Diskelektrophorese	32
1)	Methode	32
2)	Ergebnisse	34
3)	Diskussion	35
VII)	Immundiffusion nach OUCHTERLONY	36
1)	Methode	36
2)	Ergebnisse	37
D)	Diskussion	38
	Zusammenfassung	40
	Versuchsphotographien	
	Literaturverzeichnis	

A) EINLEITUNG

Menschliches Parotissekret wurde von vielen Arbeitsgruppen charakterisiert und chemisch analysiert. Anhand dieser Untersuchungen sollte der Sekretionsprozess in der Glandula Parotis beobachtet werden: die Synthese der Sekretbestandteile, ihr Transport und ihre Speicherung in den Drüsenzellen sowie der Ausstoß in die Speichelflüssigkeit. Um einen Einblick in diese Vorgänge zu erhalten, ist es nötig, Proteine und andere Bestandteile des Sekrets zu identifizieren und strukturell aufzuklären.

Über die Isolierung einzelner Proteinfractionen wurde schon von einigen Arbeitskreisen berichtet (CHAUNCEY 1954 (9) und 1957 (10); TOMASI 1963 (44) und 1968 (45); WOLF und TAYLOR 1964 (49) und 1967 (50); MASSON u.a. 1965 (29); MANDEL und ELLISON 1961 (27) und 1965 (28); MORIYA u.a. 1965 (32); BALEKJIAN (2) und 1972 (3); KAUFFMAN u.a. 1970 (22); ARMSTRONG 1971 (1); BRANDTZAEG 1971 (7).

Individuelle Schwankungen der Sekretzusammensetzung bei Normalpatienten und pathologische Sekretveränderungen hinsichtlich der Eiweißzusammensetzung hingegen sind bislang wenig erforscht worden. Um einen Bezugspunkt für die einzelnen Eiweißfraktionen zu erhalten, müssen zunächst Normalsekrete untersucht werden. In der Literatur existieren viele Berichte über Elektrophoresetechniken zur Bestimmung der Komponentenanzahl im menschlichen Parotisspeichel.

Folgende Techniken fanden hauptsächlich ihre Anwendung: Moving-boundary-Elektrophorese (ZIPKIN, ADAMIK, SAROFF, 1957 (51); GELLER, HAMES, ROVELSTAD, 1959 (18); PATTON und PIGMAN, 1959 (34)),

Papierelektrophorese (WEINSTEIN, HESKINS, JACKSON, 1960 (47); WEISS und HABER, 1964 (48); FERGUSON, KRAHN, HILDES, 1958 (17); MANDEL und ELLISON, 1961 (27); ZIPPEL, MEYER, BIETZ, 1968 (52)),

Zellulose-Acetat-Elektrophorese (D'SILVA und FERGUSON, 1962, (14)),

Diskelektrophorese in Polyacrylamidgelen (MEYER und LAMBERTS, 1965 (31); GIFFORD und YUKNIS, 1965 (19); STEINER und KELLER, 1968 (41); CALDWELL und PIGMAN, 1965 (8)),

und die Immunelektrophorese (STOFFER, KRAUS, HOLMES, 1962 (43); SIMONS, 1964 (39); ELLISON, 1966 (15); LEVINE und ELLISON, 1973 (26).

Anhand dieser Arbeiten ist es möglich, die Vielfalt der Eiweißkomponenten aufzuzeigen, obwohl es den Autoren bislang nicht gelungen war, die Anzahl der Einzelkomponenten mit Sicherheit zu bestimmen, sie in der Gesamtheit zu charakterisieren und zuzuordnen.

Das Ziel dieser Arbeit war es nun, Proteinkomponenten von stimuliertem Parotissekret anhand eines Vergleichs von verschiedenen Elektrophoresetechniken darzustellen und die einzelnen Techniken auf ihre Aussagemöglichkeit zu untersuchen.

Wir verwandten dazu folgende elektrophoretischen Untersuchungsmethoden:

Die eindimensionale Immunelektrophorese nach SCHEIDEGGER (38), die zweidimensionale Immunelektrophorese nach LAURELL (25) und FREEMAN (11), die Gegendiffusionselektrophorese nach OUCHTERLONY (33) und die Acrylamiddisk-elektrophorese (30).

B)

THEORETISCHE GRUNDLAGEN

I.) Gesamteiweißbestimmung

Bei Dialyse der Parotissekrete ist nach DAWES, 1963 (12) mit einem Verlust von 2,5% des Gesamtproteins zu rechnen. Niedermolekulare Proteine wie Lysozym mit einem Molekulargewicht von 15.000 gehören zur Gruppe der dialysierbaren Substanzen. Es durchdringt die Membran der Dialyseschläuche, wie MANDEL und ELLISON (1965) (28) und REVIS (1971) (37) in einer Arbeit aufzeigten. Das Lyophilisat der dialysierten Sekrete enthält folglich nicht dialysierbare Proteine.

II.) Eindimensionale Immunelektrophorese nach SCHEIDEGGER

Die Methode der Immunelektrophorese, von GRABAR und WILLIAMS (20) entwickelt und erstmals 1953 mitgeteilt, kann als Kombination eines physikalisch-chemischen und eines immunchemischen Untersuchungsverfahrens angesehen werden. Im Agar- oder Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennte Proteingemische werden der Einwirkung eines präzipitierenden Antiserums ausgesetzt. Das in eine Rille eingebrachte Antiserum diffundiert gegen die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine und erzeugt in Agar bei Zusammentreffen der jeweils homologen Antigene Präzipitationslinien.

Im Versuchsablauf lassen sich zwei Phasen erkennen:

1. Die Transportphase
2. Die Diffusionsphase

Unter Einwirkung des Gleichstromfeldes kommt es nach Auftragen des Antigens und seiner Diffusion in das Trägergel zur sogenannten Transportphase.

Bei Auftrennung der Serumproteine zeigen die Albumin-, alpha-1- und alpha-2- Fraktionen sowie ein Teil der beta-Fraktion eine anodische, die beta-2- und die gamma-Fraktion eine kathodische Wanderungstendenz.

Bei Verwendung von Agar ist das Phänomen der Elektroendomose zu beobachten. Es handelt sich um eine Sekundärererscheinung, die eine Wanderung der gesamten im Gel enthaltenen Flüssigkeit entgegen der elektrophoretischen Bewegung bewirkt. Die Position eines Proteins nach Beendigung der Elektrophorese wird durch den elektrophoretischen Transport und der Verlagerung durch Endomose bestimmt. Auf der anodischen Seite wird durch den Wasserentzug die Agarschicht abgeflacht. Bei Verwendung der Agarose, dem reinen Polygalaktan (ohne die sauren Gruppen des Agaropektins) ist die Endomose wegen ihrer geringen Ausmaße zu vernachlässigen.

In der anschließenden Diffusionsphase ist die Art und Geschwindigkeit der Diffusion von mehreren Faktoren abhängig. Annähernd ähnliche Verhältnisse wie im freien Milieu erhält man,

je größer die Porengröße des Gels und je niedriger die Konzentration, je kleiner die Moleküle und je runder die Molekülform ist.

Mit der Diffusionsphase beginnt zugleich die Präzipitationsphase. Das Antigen diffundiert radial vom Zentrum seiner Zone aus, das Antiserum linear von der Auftragsrinne aus. Die Streckung der Bögen ist eine Folge der Heterogenität des Antigens und der damit verbundenen unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit der Einzelkomponenten einer Proteingruppe.

Mit Sicherheit erfolgt eine Präzipitation am Äquivalenzpunkt; darüber hinaus finden sich Präzipitationserscheinungen innerhalb eines bestimmten Bereiches, der sog. Äquivalenzzone. Die Schärfe dieser Zone nimmt mit der Reinheit des Antigens zu.

Optimale Bedingungen für die Entwicklung der Linien bieten Temperaturen von 18-25° C.

Entscheidend für die gute Entwicklung der Präzipitationslinien ist das optimale Verhältnis zwischen der Konzentration des Antigens und dem Titer des Antikörpers. Als äußerste Minimalmengen können am Äquivalenzpunkt noch 3×10^{-6} g Globulin nachgewiesen werden. Die geringste mit der Methode nach SCHEIDEGGER noch darstellbare Proteinmenge beträgt $0,1 \times 10^{-6}$ g.

Das Auftreten konfluierender Präzipitationslinien bei der eindimensionalen Immunelektrophorese, wie z.B. im Amylasenbereich, kommt durch Auftreten gleicher Antigendeterminanten oder Epitope in verschiedenen Proteinen zustande. Die Epitope setzen eine Art Antigenmuster für jedes Protein zusammen. Besitzen verschiedene

Proteine gemeinsame Antigenmuster, so kommt es zu partieller Antigenverwandschaft und damit gegenüber einem spezifischen Antikörper zu Kreuzreaktionen (24) (4).

III.) Zweidimensionale Immunelektrophorese nach LAURELL, modifiziert nach CLARKE und FREEMAN

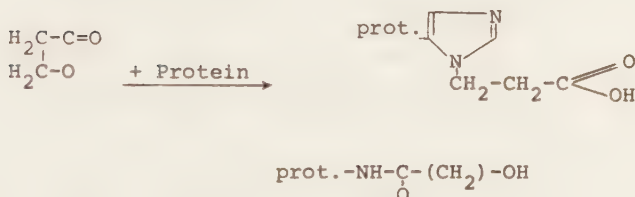
Die Methode der zweidimensionalen Immunelektrophorese geht auf eine frühere Arbeit von RESSLER (1960) (36) zurück, deren Problematik von LAURELL (1965) (25) wieder aufgegriffen wurde und schließlich von CLARKE und FREEMAN (1968) (11) weiter modifiziert und zu einem quantitativen Verfahren ausgearbeitet wurde.

Im Prinzip ist diese Methode eine Kombination der einfachen Agarosegel-Elektrophorese mit der Elektroimmundiffusion. In der ersten Dimension werden die zu untersuchenden Proteingemische in einem antikörperfreien Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, während in der zweiten Dimension eine quantitativ auswertbare Immunpräzipitation in einem Agarosegel erfolgt, das ein oligo- oder polyspezifisches Antiserum enthält (5).

Durch Modifizierung (STEPHAN und FRAHM, (1971) (42)) gelingt bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese eine gleichzeitige Bestimmung der Immunglobuline und der übrigen Serumproteine. Die Proteinprobe wird mit beta-Propiolacton, einem chemischen Agens, modifiziert, das die negative Ladung der Proteine, insbesondere der Immunglobuline, erhöht. Diese wandern dann in gleicher Richtung zusammen mit

den übrigen Proteinen in die antikörperhaltige Agarose und bilden nahezu symmetrische, gut auswertbare Peaks.

Als acylierendes Agens reagiert beta-Propiolakton vor allem mit dem Histidin und Lysin der Serumproteine.



Hierbei wird die negative Ladung und damit die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld erhöht.

Die beta-Propiolakton-Konzentration wird so gewählt, daß man den gewünschten Effekt erzielt, ohne die immunologischen und andere biochemische Eigenschaften der Serumproteine wesentlich zu verändern. Durch die Reaktion von beta-Propiolakton mit den Serumproteinen tritt eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Verschiebung der einzelnen Serumfraktionen zueinander auf (16).

IV.) Diskelektrophorese

Die Diskelektrophorese ist zur Auftrennung von Proteinen und Protein-Carbohydrat-Komponenten

des menschlichen Speicheldrüsensekrets gut geeignet. Robert CALDWELL und Ward PIGMAN (1965) (8) entwickelten die Diskelektrophorese mit Polyacrylamidgelen zur Auftrennung von Speichelkomponenten.

In der Diskelektrophorese liegt hinsichtlich pH-Wert, Pufferzusammensetzung und Gelporengröße ein "diskontinuierliches" Trennsystem vor, in dem das Polyacrylamidgel als Trägergel fungiert.

Auf Grund zweier physikalischer Effekte erreicht die Diskelektrophorese ihr Auflösungsvermögen:

1) Der Konzentrierungseffekt nach den theoretischen Grundlagen der Kontinuitäts- oder Regulationsfunktion nach KOHLRAUSCH entsteht durch Verwendung von Pufferpaaren unterschiedlicher pH-Werte und erbringt vor Trennbeginn schmale, sehr hoch konzentrierte Startzonen, die für scharfe Trennungen Voraussetzung sind. Die Konzentrierung der Proteinlösung erfolgt durch Beweglichkeitsunterschiede der beteiligten Ionen. (23)

2) Der Molekularsiebeffekt:

Gele zeichnen sich durch hohe Viskosität und damit durch hohen Reibungswiderstand aus. Wanderrnde Teilchen erfahren daher je nach ihren Dimensionen unterschiedliche Reibungswiderstände. Die Moleküle werden elektrophoretisch, also nicht nur nach ihrer elektrischen Ladung, sondern auch nach ihrer Molekülgröße, Molekulargewicht und Molekülgestalt (Tertiärstruktur) getrennt. Der Molekularsiebeffekt kommt aber nicht in allen Gelarten zur gleichen Wirkung:

Während er in Polyacrylamid- und Stärkegenen vorherrscht, ist er im Agargel unterdrückt. Polyacrylamidgele haben den weiteren Vorteil, ein synthetisches Polymerisationsprodukt und damit immer gleich reproduzierbar zu sein. Ferner sind sie in einem Konzentrationsbereich von 2 bis 30% zu verwenden, ohne ihre Transparenz zu verlieren. Damit ist die Dichte des Gelgitterwerkes bzw. die Porengröße in einem weiten Bereich variierbar (30).

V.) Immundiffusion nach OUCHTERLONY

Es handelt sich bei dieser Technik um eine Doppeldiffusion in zwei Dimensionen, bei der verschiedene Antigene und Antiseren direkt verglichen werden können. Anordnung und Kombination von Antigen und Antiseren sind sehr variabel. Mit dieser Methode ist daher eine weitgehende Differenzierung von identischen, partiell identischen und nicht identischen Antigenen und Antiseren möglich. So ist diese Methode geeignet, im Vortest einzelne Serumproteinbestandteile eines Proteingemisches mit oligo- oder monospezifischen Antiseren nachzuweisen. Hat man ein monospezifisches Antiserum vorgegeben, kann damit das homologe Antigen in einem unbekannten Gemisch direkt nachgewiesen werden. Die Präzipitationslinien bilden sich an der Stelle aus, wo Antigen und Antikörper in optimalen Proportionen zusammentreffen. Die Lage der Bande zwischen dem Auftragstellen von Antigen und Antikörper hängt von der relativen Konzentration der Reaktionspartner ab. Wenn Antigen oder Antikörper in beträchtlichem Überschuß vorliegen,

kann sich keine Bande im Agar zwischen den Löchern ausbilden. Das Präzipitat wird sich im Auftragsloch der niedrigkonzentrierten Komponente bilden. Bei hexagonaler Anordnung der Antigen-Auftragsstellen fließen die Präzipitate bei Versuchen mit Antigenkomponenten, die hinsichtlich Ihrer immunologischen Reaktivität identisch sind, bogenförmig zusammen. Werden zwei kreuzreagierende Antigene in benachbarte Stanzlöcher gegeben, so ist ein ähnliches Verschmelzen der Banden zu erkennen; das homologe Antigen zeigt aber einen zusätzlichen Sporn, der sich über den Verschmelzpunkt hinaus erstreckt (21).

VI.) Immunisierung der Kaninchen gegen menschliches Parotissekret

Der Wirkungsmechanismus des von uns zur Immunisierung verwendeten FREUNDS kompletten Adjuvans, einer Wasser- in -Öl-Emulsion mit Mykobakterien, ist noch nicht vollständig aufgeklärt worden.

Dieses Adjuvans erzeugt eine sehr große Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ. Wahrscheinlich sind die Bedingungen, unter denen die rezirkulierenden Lymphozyten mit dem Immunogen innerhalb des Riesenzellgranuloms, das sich an der Injektionsstelle gebildet hat, zusammentreffen von ganz entscheidender Bedeutung für die Induktion der zellulären Immunität. Der Adjuvanseffekt auf den Antikörpertiter des Serums könnte eine Folge der Sensibilisierung vom verzögerten Typ sein. Denn wenn Antigene in Tiere injiziert werden, die gerade gegenüber einem anderen Antigen eine Sensibilisierung vom verzögerten Typ durchmachen, so stimulieren

diese eine verstärkte Antikörperantwort. Es könnte daher sein, daß die persistierenden Mykobakterien im kompletten FREUND' schen Adjuvans als kontinuierlicher Reiz für eine Sensibilisierung vom verzögerten Typ wirken, wodurch die Reaktionslage des Tieres so verändert wird, daß es auch leichter Antikörper gegen andere Immunogene bildet (21).

C) PRAKTISCHE AUSFÜHRUNG

I.) Speichelgewinnung und Modifizierung

1.) Speichelgewinnung

Zur Gewinnung des Speichels wurde mit einem Polyvinylschlauch ($\emptyset$ außen 1mm; innen 0,5 mm) der Ductus parotideus sondiert. Die Speichelflußstimulierung erfolgte durch Ascorbinsäuretabletten.

a) Lyophilisat

20 Speichelproben von gesunden Probanden jeden Alters, davon 7 Mischspeichel, wurden entnommen, zentrifugiert (3600 U/min) und lyophilisiert.

b) Frischspeichel

36 weiteren Versuchspersonen, männlichen und weiblichen Geschlechts aller Altersstufen, wurden nach Stimulierung 4-6ml Speichel entnommen.

Diese Proben wurden 1-2 Tage im Kühlschrank bei ca. 4° C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.) Modifizierung bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese

a) Lyophilisierter Speichel

Den 20 lyophilisierten Speichelproben wurden je 30mg Lyophilisat entnommen und in 4 ml TRA-Puffer gelöst. Nach Zu-

Tabelle 1

PATIENT	VERSUCHS- BEZEICHNUNG	MENGE DES FRISCHSP. (ml)	GEWICHT DES LYOPHILISATES (mg)	mg/ml
1	A ₁	40	209,5	5,23
2	A ₂	40	209,0	5,22
3	B	45	268,5	5,96
4	C	45	143,0	3,17
5	D	45	311,5	6,92
6	E	60	392,0	6,53
7	F	40	126,0	3,20
8	G	55	349,7	6,36
9	H	52	267,3	5,14
10	I	45	261,0	9,80
11	K	42	287,0	6,83
12	L	52	276,0	5,30
13	M	60	404,0	6,73
14 PM 1	PM 1	50	287,0	5,74
15 PM 2	PM 2	125	928,0	7,50
16 PM 3	PM 3	65	394,0	6,06
17 PM 4	PM 4	60	309,7	5,16
18 PM 5	PM 5	85	469,0	5,52
19 PM 6	PM 6	110	1030,0	9,36
20 PM 7	PM 7	72	616,6	8,56
Mittelwert:				6,02

gabe von 32 μ l beta-Propiolakton und nach 2-stündiger Modifizierung erfolgte eine 24-stündige Dialyse zur Entfernung der Salze. Anschließend wurden die Einzelproben wieder lyophilisiert und im Exsikkator bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

b) Frischspeichel

Zur Entfernung von Zellresten und sonstigen Verunreinigungen wurden die Speichelproben 15 min bei 3600 U/min. zentrifugiert. 4 ml Speichel wurden entnommen, mit 4 ml TRA-Puffer versetzt. Nach Zugabe von 32 μ l beta-Propiolakton (SCHUCHARDT) erfolgte eine 2-stündige Inkubation der Sekretproben in einem 37° C-Wasserbad. Die Entfernung der Salze und eine gleichzeitige Konzentrierung der Lösungen wurde durch Druckdialyse in Kollodiumhülsen (SARTORIUS) bis zur vollständigen Trockne erreicht.

II.) Immunisierung der Kaninchen gegen menschliches Parotissekret.

5mg nicht dialysierter, lyophilisierter Mischspeichel wurden in 0,5 ml NaCl-Phenol (1% Phenol in physiologischer Kochsalzlösung) gelöst und mit 0,5 ml FREUNDS kompletten Adjuvans (Bacto, Adjuvant, complete, Freund for laboratory use; DIFCO LABORATORIES Detroit Michigan USA) gemischt. Diese Emulsion wurde jedem der fünf Tiere einleitend in dreitägigem Abstand dreimal

und fortlaufend einmal wöchentlich injiziert. Das nach drei Wochen entnommene Serum zeigte bei einem Probelauf der eindimensionalen Elektrophorese noch sehr schwache Präzipitate. Bei der zweiten Blutentnahme nach fünf Wochen waren die Präzipitationslinien gut ausgeprägt. Zwei Wochen später wurden die Kaninchen getötet und das gewonnene Serum konserviert.

III.) Gesamtproteinbestimmung

1.) Methode

Zur Gesamtproteinbestimmung wurden definierte Mengen dialysierten und lyophilisierten Reizsekretes abgewogen und auf die Ausgangsmenge bezogen, umgerechnet.

2.) Ergebnisse

Wir erhielten Werte im Bereich von 1,3-5,0 mg Eiweiß pro ml Reizsekrete, im Durchschnitt 3,1mg Eiweiß pro Sekret.

Tabelle 2

A ₁	3,1mg/ml	K	3,0mg/ml
A ₂	2,5mg/ml	L	2,6mg/ml
B	2,6mg/ml	M	3,1mg/ml
C	1,5mg/ml	PM ₁	2,9mg/ml
D	4,6mg/ml	PM ₂	3,8mg/ml
E	3,2mg/ml	PM ₃	2,9mg/ml
F	1,3mg/ml	PM ₄	2,7mg/ml
G	3,4mg/ml	PM ₅	2,8mg/ml
H	3,2mg/ml	PM ₆	4,8mg/ml
I	3,3mg/ml	PM ₇	5,0mg/ml

3.) Diskussion

Die erhaltenen Werte unserer Gesamtproteinbestimmung stimmen annähernd mit denen von DAWES und ONG (1973) (13), VOGT und ZAHL (1973) (46), RAUCH (1959) (35), WOLF und TAYLOR (1964) (49) sowie SKURK u.a. (1971) (40) überein. In den beiden letztgenannten Arbeiten wurde auch gezeigt, daß der Bestimmungswert stark von der Bestimmungsmethode abhängt, da z.B. die Mikro-KJELDAHL-Methode den Proteinstickstoff bestimmt, wohingegen die Biuret-Methode die Anzahl der Peptidbindungen erfaßt, und die Methode nach LOWRY von der Anzahl der Peptidbindungen und vom Gehalt an den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan abhängig ist. Jede Methode erfaßt also eine andere Eigenschaft der zu charakterisierenden Proteine. Die Schwankungsbreite der

erhaltenen Werte kann bis zum Vierfachen betragen (49). Bei dialysiertem, lyophilisiertem Speichel sind dagegen nur mit Verlustwerten von 2,5% der Gesamtmenge Protein zu rechnen (12).

IV.) Eindimensionale Immunelektrophorese

1.) Methode

Reagenzien und Geräte:

- 1) Objektträger aus Glas (26x76mm)
- 2) Elektrophoresepuffer
 - a) Diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer-
lösung pH 8,2 $\mu = 0,1$
 - b) Barbitalpuffer pH 8,6 $\mu = 0,02$
- 3) Gele
 - a) Agargel pH 8,2
 - b) Agarosegel pH 8,6
- 4) Gelstanze (Boskamp)
- 5) Elektrophoreseapparatur (Boskamp)
- 6) Antisera
 - a) Anti-Human-Serum vom Kaninchen
(Behringwerke)
 - b) Anti-Parotisspeichel-Serum vom
Kaninchen (nach Immunisierung von
fünf Kaninchen)

Herstellung der Puffer:

- a) Diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer
pH 8,2 nach Michaelis
13,38 g Natriumdiäthylbarbiturat und
8,83 g Natriumacetattrihydrat in 1,5 l
dest. Wasser gelöst.
pH-Einstellung auf pH 8,2 durch Zugabe
von 0,1n HCl (ca. 180 ml) Ionenstärke
der Lösung $\mu = 0,1$
- b) Barbitalpuffer pH 8,6
41,2 g Barbital Natrium (5,5-Diäthyl-
barbitursäure-Natrium-Salz) und 8,0 g
Barbital (5,5-Diäthylbarbitursäure) in

10 l dest. Wasser gelöst. pH-Einstellung auf 8,6. Ionenstärke der Lösung $\mu = 0,02$.

Herstellung der Gele:

a) Agargel pH 8,2

2 g Agar purum (Behringwerke) und 50 ml Diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer sowie 50 ml Aqua dest. wurden nach Zusatz von 10 mg Thiocid (zur Hemmung des Mikroorganismenwachstums) bis zur Klärung der Lösung im Wasserbad gekocht.

b) Agarosegel pH 8,6

1,5g Agarose (Behringwerke) wurde durch Erhitzen im Wasserbad in 100 ml Barbituratpuffer gelöst. Ebenfalls Zugabe von 0,1 mg Thiocid pro ml Puffer.

Herstellung von Gelplatten:

3ml der auf 80° C abgekühlten Gele wurden auf die entfetteten Objektträger unter Verwendung eines Horizontaltisches aufgegossen. Mit der Gelstanze (Rille: 1 mm breit, 55 mm lang; zwei Auftragsstellen: $\varnothing$ 1 mm, Abstand zur Rille 1 mm) wurden die Auftragsstellen gestanzt.

Auftragen von Testsubstanzen:

Die aufgetragenen Mengen Parotisspeichel und Humanserum änderten sich im Verlauf der Versuche. Das Verhältnis der lyophilisierten Ausgangsmenge für den aufzutragenden Parotisspeichel

zur lösenden Puffermenge war in allen Versuchen gleichbleibend: 25mg nicht dialysierter, lyophilisierter Speichel wurden in 100 μ l Puffer gelöst. Mit der Mikroliterpipette wurden aufgetragen:

- 1) 2-6 μ l Humanserum
- 2) 2-6 μ l gelöstes Lyophilisat

Elektrophorese

Nach Markierung des Albumins im Proteingemisch mit Bromphenolblau zur Überprüfung des Laufes wurde die Elektrophorese gestartet. Sie dauerte bei einer Feldstärke von 5-6 V/cm und einer Ausgangsspannung am Gleichrichter von 400-625 V ca. 1-1,5 h. Nach Beendigung der Auftrennung wurde die Gelrille mit 50-100 μ l Antiserum aufgefüllt. Während der Immundiffusion lagen die Objektträger ungefähr 24 h in einer feuchten Kammer. Nach 16-24 h ließen sich die Präzipitate gut erkennen. Zur Entfernung der nicht präzipitierten Proteine wurden nach Abschluß der Präzipitation die Gele bei mehrmaligem Wechseln der Bäder drei Tage in physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen.

Trocknung und Färbung der Gelplatten:

Vor der Färbung wurden die Gelschichten gepreßt und getrocknet. Die mit dest. Wasser gespülten Objektträger wurden auf der Gelseite mit Filterpapier abgedeckt. Als saugfähige, druckausgleichende Zwischenlage wurde eine 1-2 cm dicke Schicht Zellstoff aufgelegt, mit einer Glasplatte abgedeckt und mit 2-3 kg Gewicht beschwert. Nach 15 min war die Gelschicht auf die Glasplatte auf-

gepreßt. Die Objektträger wurden nochmals gespült und anschließend im Warmluftstrom vollständig getrocknet. In einen Plattenhalter eingeordnet, wurden die Plättchen 10 min in die Färbelösung gegeben. Zur Entfärbung des Untergrundes erfolgte ein viermaliger Wechsel der Entfärbebäßer. Die an der Luft vollständig getrockneten Plättchen wurden mit Versuchsangaben beschriftet und photographiert.

Herstellung der Färbelösung "Coomassie Brilliant-Blue R":

10 g Coomassie Brilliant Blue R
900 ml Äthanol 96 %, 200 ml Eisessig
900 ml dest. Wasser wurden vermischt und vor Gebrauch zur Entfernung des Farbüberschusses filtriert.

Herstellung des Lösungsmittels zum Entfärben:

4,5 l Äthanol 96 %
1 l Eisessig und 4,5 l dest. Wasser wurden gemischt. Durch Behandlung mit Aktivkohle konnte das Entfärbebad für den wiederholten Gebrauch regeneriert werden. (4)

2.) Ergebnisse:

a) Immunelektrophorese gegen Antihumanserum

Nach elektrophoretischer Auftrennung von Parotissekret gegen Antihumanserum fanden wir bei allen Speichelproben zwei deutliche Banden. Eine der beiden Banden lag im Anodenbereich, die zweite zentrisch um die Auftrag-

stelle. Eine monospezifische Überprüfung mit Anti-IgA-Serum identifizierte die zweite Bande als Immunglobulin A. Die anodennahe Bande zeigte sich bei Vergleich mit aufgetrenntem Humanserum im Albuminbereich. Eine monospezifische Überprüfung gegen Anti-Albumin-Serum identifizierte dieses Protein als Albumin. Bei allen eindimensionalen immunelektrophoretischen Auftrennungen gegen Antihumanserum stellten sich die beiden identifizierten Banden dar.

Leichte schleierartige Präzipitate im Bereich zwischen der Auftragestelle und dem Albuminbereich, wie auch im Immunglobulinbereich deuteten das Vorhandensein weiterer Serumproteine an, die aber in nicht ausreichend hoher Konzentration vorliegen und deshalb nicht deutlich präzipitieren (Abb. 1). Aufgrund der semiquantitativen Aussagemöglichkeit der eindimensionalen Immunelektrophorese kann man folgern, daß die Proteinkonzentrationen der Peaks von Patient zu Patient um das 2-3 fache variieren und auch interindividuell variieren, so daß wir Patienten finden, bei denen der Albuminanteil relativ höher liegt bei zugleich normalem Immunglobulin-A-Peak, und Patienten, bei denen das Umgekehrte der Fall ist.

b) Immunelektrophorese gegen Parotisssekret-Antiserum vom Kaninchen

Bei der Immunelektrophorese gegen Antiparotisserum fanden wir bei Vergleich gegen Antihumanserum eine deutliche Bandenvermehrung. Nach 6-wöchiger Immunisierung der Versuchskaninchen war eine erste Antikörperreaktion nachzuweisen. Wenigstens 7 Banden

waren deutlich zu erkennen, während die Reaktion mit Normalserum nur 5 Banden zeigt. Dabei schwankten die Antiseren der einzelnen Tiere auffallend in ihrem Antikörpergehalt. Die Linienschärfe und die Farbintensität der Banden waren folglich recht unterschiedlich (Abb. 2).

Bei Vergleich der Reaktion gegen Humanserum mit der gegen Parotissekret zeigte sich die IgA-Bande als die größte und schärfste Serumproteinbande. Deutlich kann man diese Präzipitationslinie erkennen, die sich bei Parotissekret zentrisch um den Auftragspunkt und bei Humanserum anodenwärts verlagert darstellt (Abb. 3).

Ebenso ist bei beiden Auftrennungen eine kurze Präzipitationslinie zu erkennen, die genau am Auftragspunkt entspringt und sich zur Anode erstreckt. Sie entspricht bei Normalserum dem Transferrin. Im Albuminbereich läßt sich in beiden Fällen eine feine Linie feststellen, weiterhin eine Linie im alpha-2-Bereich und eine angedeutete im gamma-Globulinbereich. Darüber hinaus können wir bei der Parotissekreteiweißauftrennung farbin intensive Präzipitationslinien um den Auftragspunkt nahe an der antiserumhaltigen Rille erkennen. Sie entsprechen den Amylasen und setzen sich aus zwei konfluierenden Präzipitationslinien zusammen.

Weiterhin stellt sich im alpha-1-Bereich eine feine Präzipitationslinie dar. Nach 11-wöchiger Immunisierung der Kaninchen hat sich der Antikörpergehalt wesentlich erhöht, was sich in der Form der Präzipitationslinien und der Bandenzahl verdeutlicht. 10-11

Banden sind bei der Reaktion mit Parotisssekret erkennbar. Eine Zunahme der Banden ist vor allem im alpha-2-Bereich und im gamma-Globulinbereich zu verzeichnen (Abb. 4). Bei gleicher Bandenzahl zeigen sich individuelle Unterschiede in der Intensität der einzelnen Banden.

3.) Diskussion

a) Immunelektrophorese gegen Antihumanserum

Bei Vergleich des Bandenverlaufes von aufgetrenntem Humanserum mit dem des Parotissekretes zeigt das Immunglobulin-A des Speichels nicht die gleiche Wanderungstendenz wie Serumglobulin-A. Es präzipitiert symmetrisch um den Auftragspunkt. Diese veränderten Wanderungseigenschaften sind auf einen Strukturwandel im Molekül zurückzuführen. Das "Secretory-Immunglobulin-A" des Speichels stellt eine dimere Form des Serum-Immunglobulin-A dar, welche über ein Protein, das sog. "Secretory-Piece" (Molekulargewicht ca. 60 000) gekoppelt ist. Das Secretory-Immunglobulin-A hat ein Molekulargewicht von 390.000 im Vergleich zum Serum-Immunglobulin-A mit einem Molekulargewicht von 160.000. Der Sedimentationsquotient des Serum-IgA von 7 S erhöht sich beim Secretory-IgA auf 11 S (16).

Das als Albumin identifizierte Präzipitat ist etwas unscharf begrenzt. Dies beruht darauf, daß die Äquivalenzzone der Kaninchen-Antiseren, d.h. der gesamte Konzentrationsbereich von Antikörper und Antigen, in dem noch Präzipitate auftreten, sehr breit ist und deshalb an den Randbereichen verwaschene Präzipitate auftreten. Ideale Konzentrationsverhältnisse von Antigen und Antikörper liegen nur am Äquivalenzpunkt vor.

b) Immunelektrophorese gegen Parotis-Antiserum vom Kaninchen

Die stark sich auffasernden Präzipitationsbögen entstanden durch Antikörperüberschuß im Antiserum nach 11-wöchiger Immunisierung. Um jedoch

auch geringe Konzentrationen an Antigen nachzuweisen, nahmen wir die unscharfen Präzipitate vor allem der Amylasen und der IgA-Bande in Kauf, konnten dafür aber auch feine Präzipitationslinien im alpha-2-Bereich und im gamma-Globulin-Bereich erhalten.

LEVINE fand bei seinen Untersuchungen 3 Banden mehr (26). Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß er mit Ziegenantiseren arbeitete. Ein direkter Vergleich mit unseren Ergebnissen läßt sich daher nicht anstellen.

V.) Zweidimensionale Immunelektrophorese

1.) Methode

Material und Geräte:

- 1) Elektrophoreseapparat System Boskamp
- 2) Barbitalspuffer pH 8,6
- 3) Agarose (Behringwerke)
- 4) Glasplatten 5 x 5 cm
- 5) Antihumanserum vom Kaninchen (Behringwerke)
- 6) Anti-Parotispeichel-Serum vom Kaninchen

Herstellung des Barbitalspuffers pH 8,6

siehe Seite 17

Herstellung der Gele:

a) Trenngel

1,5g Agarose und 100 ml Barbitalspuffer pH 8,6 wurden im Wasserbad nach Zugabe von 0,1 mg/ml Thiocid zum Sieden erhitzt. Nach Klärung der Lösung wurde sie auf 80° C abgekühlt.

b) Antiserum-haltiges Gel

Das Zumischen von Antiserum erfolgte bei Temperaturen von 50° C - 56° C. Auf 3 ml 1,5 %-ige Agaroselösung wurden 250 µl Antihumanserum gegeben. Bei Anti-Parotissekret-Serum variierten die Werte zwischen 400 - 600 µl/3ml. Die Temperatur der Agaroselösung muß unter 56° C liegen, da sonst die Proteine des Antiserums denaturieren.

Herstellung der Platten:

4 ml heiße Agaroselösung (80° C) wurden gleich-

mäßig auf die auf dem Horizontaltisch deponierten Gläser (5x5 cm) aufgetragen. Nach Erstarren der Flüssigkeit erfolgte die Auftrennung der Gelbereiche in Trenngel und späterem Präzipitationsgelbereich. Ein 1 cm breiter Streifen diente als Trenngel. 1/2 cm vom Rand entfernt wurden die Auftragsstellen gestant: In einer Versuchsreihe eine bandartige Auftragsstelle 20 µl Antigen fassend, in einer weiteren ein Loch mit einem Durchmesser von 4 mm.

Elektrophoreseablauf:

1. Dimension

10-20 µl der in 50 µl Elektrophoresepuffer gelösten Ausgangsmenge von

- a) 4 ml Frischspeichel, druckdialysiert,
 - b) 30 mg lyophilisierter Speichel, dialysiert,
- wurden aufgetragen. Das Albumin wurde mit Bromphenolblau markiert. Als Kontakt zwischen Gelplatten und E.-Puffer dienten 0,3 mm dicke, doppelt gefaltete Filterpapierstreifen. Die Wanderung der gesamten modifizierten Serumproteine erfolgte im verwendeten alkalischen Bereich pH 8,6 von der Kathode zur Anode.

Elektrophoresebedingungen:

Puffer in beiden Kammern: Barbitalpuffer pH 8,6;

µ = 0,02. Ausgangsspannung am Gleichrichter:

ca. 450 V. Feldstärke: 8-10 V/cm

Stromstärke je nach Plattenzahl

Elektrophoresedauer: ca. 90 min unter Wasserkühlung.

2. Dimension

Sofort nach Auftrennung der Proteine wurden die

nicht als Trennungsgel verwendeten Agaroseanteile entfernt, die Platten gesäubert und getrocknet. 3 ml antiserumhaltige Agarose (ca. 50° C) wurden an das Trenngel gegossen. Die Platten wurden im rechten Winkel zur ersten Laufrichtung auf die Trägerplatte der Apparatur zurückgelegt und mit neuen Filterpapierstreifen versehen. Die Kammern enthielten wie bei der ersten Dimension Barbitalpuffer pH 8,6. Die Wanderung der Proteine erfolgte wieder von der Kathode zur Anode.

Elektrophoresebedingungen:

Ausgangsspannung am Gleichrichter: ca. 200 - 225 V

Feldstärke: 2-3 V/cm

Stromstärke der Plattenzahl entsprechend

Elektrophoresedauer: 7-8 h unter Wasserkühlung

Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Agaroseplatten ca. 3-4 Tage lang in physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen. Jeden Tag wurden die Bäder gewechselt. Trocknung und Färbung erfolgte wie bei der eindimensionalen Immunelektrophorese (5).

2.) Ergebnisse:

a) Zweidimensionale Immunelektrophorese gegen Antihumanserum

Die Ergebnisse mit druckdialysiertem Frischspeichel und lyophilisiertem Speichel waren unterschiedlich. Während bei Verwendung von Frischspeichel 9 Peaks sichtbar wurden, waren es bei lyophilisiertem Speichel 6 Peaks. Dabei lag der größte Peak immer im gamma-Globulin-Bereich und wurde durch monospezifische Überprüfung als IgA-Peak identifiziert. Die schärfsten, farbintensivsten Konturen wies der anoden-nahe Albumin-Peak auf. Ein sehr fein gezeichneter Peak, anodenwärts vor dem Albumin-Peak liegend,

ließ sich nur bei Verwendung von Frischspeichel nachweisen. Es handelt sich um Präalbumin. Zwischen dem Albumin-Peak und dem IgA-Peak ließen sich bei allen Speicheln 3-4 weitere Peaks erkennen, die im Vergleich mit Humanserum den alpha-1, alpha-2 und gamma-Globulinen entsprechen. (Abb. 5)

Ein weiterer flacher Peak im gamma-Globulinbereich war wiederum nur bei Frischspeichel nachweisbar. Es stellten sich sowohl in der Gruppe der Lyophilisate wie in der Gruppe der Frischspeichel die gleichen Peaks dar. Individuelle Unterschiede der einzelnen Eiweißfraktionen, die sich schon in der eindimensionalen Immunelektrophorese zeigten, wurden bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese noch signifikanter. Der Albumin-Peak und der IgA-Peak zeigten daher die größten Schwankungen (Abb. 6). Bei Verwendung gleicher Konzentrationen und gleicher Versuchsbedingungen sind die Präzipitate gut reproduzierbar (Abb. 7).

b) Zweidimensionale Immunelektrophorese gegen Parotissekret - Antiserum vom Kaninchen:

Im Vergleich zu den elektrophoretischen Ergebnissen bei der Elektrodifusion gegen Antihumanserum zeigte sich bei der von Parotissekret gegen Parotissekret-Antiserum eine deutliche Peakveränderung.

Der Titer der Antiseren war bei gleichen Immunisierungsbedingungen nicht bei allen Kaninchen gleich. Von fünf Kaninchen erzeugte nur ein Tier ein für die wesentlich empfindlichere zweidimensionale Elektrophorese verwendbares Antiserum. Trotz der unterschied-

lichen Güte der Kaninchenantiseren konnte man bei allen Speichelproben und allen Kaninchenantiseren zwei Peaks deutlich erkennen: einer als Bandengruppe im beta-Globulinbereich, der den Amylasen und Isoamylasen entspricht, und ein weiterer im gamma-Globulinbereich, der IgA darstellt.

Weitere Peaks waren nur bei einem Immunserum zu erhalten (vergl. Abb. 8). Eine nach zweimonatiger Immunisierung gewonnene Antiserumprobe erzeugte insgesamt 5 Peaks und zwar die genannten Amylase- und IgA Peaks und 3 weitere fein konturierte Peaks, einer im alpha-1 Bereich, ein zweiter anodenwärts dem Amylase-Peak vorgelagert im alpha-2-Bereich und ein sehr schwach ausgeprägter im beta-Globulinbereich (Abb. 9).

Das nach dreimonatiger Immunisierung gewonnene Antiserum zeigte eine signifikante Peakvermehrung. Wenigstens 10 Peaks waren zu erkennen. Der Peakkomplex der Amylasen hatte sich in 4-5 Linien aufgefasert, im beta-Globulinbereich und im gamma-Globulinbereich hatte sich je ein weiterer Peak gebildet, und im Albuminbereich war ein sehr hoher, in den Konturen verschwommener Peak zu erkennen (Abb. 10).

Bei den Versuchen mit diesen Antiseren ließen sich bei fast allen Patienten die gleichen Peaks feststellen. Beachtliche quantitative Unterschiede der Speichelkomponenten wurden besonders bei dieser Art der Immunelektrophorese deutlich.

3.) Diskussion:

a) Zweidimensionale Immunelektrophorese gegen Antihumanserum

Die zweidimensionale Immunelektrophorese ermöglicht gegenüber der Elektrodifusion eine bessere Aussage über quantitative Veränderungen der einzelnen Proteinkomponenten. Durch Vergleich der Präzipitationsbögen mit den standardisierten Präzipitaten von stabilisiertem Standard-Humanserum ist eine quantitative Aussage zu erreichen. Große Schwankungen in den Konzentrationen der einzelnen Speichelkomponenten wurden folglich besonders bei dieser Form der Elektrophorese deutlich. Auffällig sind bei dieser Elektrophorese die unscharfen, verzerrten Kon-turen und die Instabilität des IgA-Peaks, die auf veränderte Präzipitationseigenschaften zurückzuführen sind, da der Serum-IgA-Antikörper mit dem dimeren Secretory-IgA des Parotisspeichels verändert reagiert.

b) Zweidimensionale Immunelektrophorese gegen Parotissekret-Antiserum vom Kaninchen:

Eine Standardisierung der Präzipitationslinien ist gegenüber der vorhergenannten Methode nicht möglich, da der erreichte Titer der Parotissekret-Antiseren zur Präzipitation mit Standard-Humanserum zu niedrig ist. Auffällig ist eine Verlagerung der Präzipitationslinien in den beta- und gamma-Globulinbereich. Die Aussagekraft dieser Methode erhöht sich gegenüber der vorhergenannten durch das Auftreten neuer Linien, wie der Amylasen und Isoamylasen, die hier die beste Darstellung finden.

VI.) Diskelektrophorese:

1.) Methode

Material und Geräte:

- 1) Gießröhrchen ($\emptyset$ innen 6 mm, $\emptyset$ außen 9 mm, Länge 10 cm)
- 2) Trenngel: 7,5 %-iges Acrylamid-Mittelpor-Gel pH 8,9
- 3) Elektrophoresepuffer pH 8,3
- 4) Elektrophoreseapparatur (WTW/Weilheim)

Herstellung von Trenngels:

Zur diskelektrophoretischen Auftrennung wurde von uns ein 7,5 %-iges Mittelpor-Gel pH 8,9 verwendet, das Proteingemische mit Molekulargewichten von 10^4 bis 10^6 auftrennt, und dessen optimaler Bereich Molekulargewichte von 3×10^4 bis 3×10^5 umfaßt, d.h. gut geeignet für Serumproteinauftrennung ist.

Es wurden 3 Grundlösungen benötigt:
pro 100 ml

- | | |
|------------------|-------------------|
| 1) 48 ml 1 n HCl | 2) 30 g Acrylamid |
| 36,6 g Tris | 0,8 g Bis |
| 0,8 g Temed | |

- 3) 60 mg/100 ml Ammoniumperoxodisulfat

(Die Lösungen 1 und 2 können vorrätig gehalten werden, Lösung 3 muß frisch hergestellt werden).

Lös. 1, Lös. 2 und dest. Wasser wurden im Verhältnis 1:2:1 zusammengegeben. Diese Mischung wurde erst unmittelbar vor dem Gießen der Gelröhrchen mit Lös. 3, die Katalysatorwirkung

besitzt, im Verhältnis 1:1 angesetzt und mußte dann sofort verwendet werden.

Gießen der Gele:

Die gesäuberten Röhrchen (Laborwaschlösung, Aqua dest-Spülungen, Ofentrocknung) wurden einseitig mit Parafilm verschlossen, mit dem gießfertigen Gel gefüllt und mit 3 mm Wasser überschichtet. Damit wurde der für die Polymerisation nötige Luftabschluß erreicht. Die Mischung benötigte ca. 2h zur Polymerisation. Nach Prüfung der Gelkonsistenz wurde das Wasser abgesaugt und die Testlösung aufgebracht.

Für die Speichellösungen wurden 5 mg Lyophilisat in 1 ml Aqua dest. gelöst und davon 0,1 ml mit der Mikroliterpipette aufgetragen. Anschließend wurde die aufgetragene Substanz vorsichtig mit Puffer 1 überschichtet. Beide Kammern der Apparatur wurden mit Puffer aufgefüllt, die obere mit Puffer 1, die untere mit Puffer 2.

Herstellung der Puffer 1 und 2:

6 g Tris und 8,8 g Glycin wurden zu einer 10 %-igen wäßrigen Pufferlösung mit eingestelltem pH 8,3 verarbeitet. Puffer 1 enthielt gegenüber Puffer 2 Thymolblau in 0,001 %-iger Lösung zur Markierung des Laufes.

Elektrophoresebedingungen:

Vorlauf: 10 min bei einer Stromstärke von 2 mA/Röhrchen.

Hauptlauf: 60 min bei 5 mA/Röhrchen

Nach Abschluß des Laufes wurden die Gele aus den Röhrchen entfernt. Dazu wurde eine lange, dünne Injektionsnadel vorsichtig zwischen Glas-

wand und Gelschicht geschoben und Glyzerin-Wasser-Lösung injiziert, solange bis sich die Gele von der Wand lösten. Die Gele wurden in mit 10 %-iger Trichloressigsäure gefüllte Reagenzgläser gegeben und 15 min zur Denaturierung der Proteinbestandteile gewaschen.

Färbung der Proteinbanden:

Nach Entfernen der Trichloressigsäure wurden die Gele 24 h in Coomassielösung gelegt.

Herstellung der Coomassielösung:

1 %-ige Coomassielösung wurde mit 10 %-iger Trichloressigsäure im Verhältnis 1:19 versetzt und filtriert. Pro Gel wurden ca. 20 ml Färbelösung benötigt. Nach einmaligem Gebrauch wurde die Lösung verworfen.

Entfärbung:

Zur Entfernung der nicht an Protein adsorbierenden Farbe wurden die Gele in 7 %-iger Essigsäurelösung 24-28 h entfärbt. Dieser Vorgang wurde durch Spülung in offenen Metallnetzen beschleunigt. Die Entfärbelösung wurde mehrmals erneuert.

Aufbewahrung und Registrierung:

Zur Aufbewahrung wurden die Gelstangen in dünne mit 7 %-iger Essigsäurelösung gefüllte Glasröhrchen gegeben und luftdicht verschlossen. In diesem Zustand konnten die Gele photographisch oder densiometrisch dokumentiert werden (30).

2.) Ergebnisse:

Bei dieser Art der Elektrophorese wurden bei Verwendung von lyophilisiertem Reizspeichel bis zu 12 Banden gezählt. Bei

einigen Patienten waren jedoch keine scharfen Einzelbanden mehr zu erkennen.

Schleierartig verschwommene Banden waren hier anstelle scharf aufgetrennter Banden zu sehen, besonders ausgeprägt im kathodennahen Amylasenbereich. Bei dieser empfindlichen Trennungsmethode mit ihrem hohen Auflösungsvermögen waren Amylasen und Isoamylasen nur bei wenigen Sekreten als saubere Banden zu erkennen. Nur die vier kathodennahen Banden vor den Amylasen waren bei fast allen Patienten sichtbar. Anodenwärts waren die auftretenden Banden stets unscharf. Auffallend war ferner eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Sekretkomponenten (Abb.11).

3.) Diskussion:

Bei der Diskelektrophorese liegt, wie bereits die Abkürzung ausdrückt, ein diskontinuierliches Trennsystem hinsichtlich pH-Wert des Gels und des Laufpuffers vor. Durch diese pH-Diskontinuitäten werden sehr schmale Startzonen erzeugt. Dadurch wird gerade bei niedrigen Eiweißkonzentrationen der aufgetragenen Substanzen eine scharfe Trennung erreicht. Dieser Vorteil, den sich schon CALDWELL und PIGMAN (8) bei der elektrophor. Auftrennung von Submandibularispeichel zunutze machten, geht bei Verwendung von lyophilisiertem Speichel verloren. Die lyophilisierten Proteine ändern gegenüber frisch gewonnenen ihre Wanderungseigenschaften. Speichellyophilisate sind folglich für

für diese Elektrophorese nicht verwendbar.
Die schleierartigen Färbungen machen eine
genaue Bestimmung der Bandenzahl unmöglich.

VII.) Immundiffusion nach OUCHTERLONY

1.) Methode

Material und Geräte:

- 1) Objektträger (76x26 mm)
- 2) Agaroselösung (pH 8,6 Barbitalpuffer)
- 3) Gelstanze Ø 2 mm
- 4) verschiedene monospezifische Antiseren
(Behringwerke) vom Kaninchen

Auf entfettete Objektträger wurden 3 ml
Agaroselösung aufgegossen. Hexagonal wurden
die Auftragstellen für die Speichelproben
eingestantzt. Eine zentrale Auftragstelle dien-
te zur Aufnahme von Antiserum. Auf einem Ob-
jektträger wurden zwei Sechsecke angeordnet.
Zentral wurden 5 µl monospezifisches Antise-
rum und ansonsten je 5 µl Speichelkonzentrat
aufgetragen. (25 mg Lyophilisat/100 µl Puffer)
Eine Testung erfolgte gegen folgende Antiseren:

- 1) Anti-Immunglobulin M
- 2) Anti-Immunglobulin G
- 3) Anti-alpha-1-Antichymotrypsin
- 4) Anti-Plasminogen
- 5) Anti-alpha-2-Makroglobulin
- 6) Anti-Albumin
- 7) Anti-Transferrin
- 8) Anti-Coeruloplasmin
- 9) Anti-beta-Lipoprotein
- 10) Anti-saures-alpha-1-Glykoprotein

Nach ca. 16-24 h zeigten sich die Präzipitationslinien. Die Platten wurden 2-3 Tage in Kochsalzlösung (0,9%) gewaschen, danach getrocknet und gefärbt wie bei der eindimensionalen Immunelektrophorese (4).

2.) Ergebnisse:

Mit dieser Methode, die eine Diffusion von Antikörper und Antigen in einem inerten Agarosegel darstellt, testeten wir Speichel gegen verschiedene monospezifische Antisera, und zwar gegen Anti-IgM, Anti-IgG, Anti-alpha-1-Antichymotrypsin, Antiplasminogen, Anti-alpha-2-Makroglobulin, Anti-albumin, Antitransferrin, Anticoeruloplasmin, Anti-beta-Lipoprotein und antiseraes-alpha-1-Glykoprotein. Bei den eingesetzten Eiweißkonzentrationen der Reizsekrete zeigten nur die Versuche mit Anti-IgG und Anti-Albumin positive Ergebnisse. Bei den weiteren geprüften Antisera konnten wir in dem von uns eingesetzten Konzentrationsbereich keine Präzipitationslinien feststellen. Albumin läßt sich bei allen Patienten nachweisen (Abb. 13). Jedoch zeigte IgG bei einigen Patienten in dem verwendeten Konzentrationsbereich keine Präzipitate mehr (Abb. 12).

D) DISKUSSION

Im Vergleich zu LEVINE und ELLISON (1973) (26), die nur das Sekret eines einzelnen Spenders untersuchten, wollten wir durch Überprüfung der Parotissekrete verschiedener Normalpatienten einen Bezugspunkt schaffen, um Bandenmuster zu finden, die als Ausgangswert für die Untersuchung pathologischer Fälle dienen können.

Die 10-11 Banden der eindimensionalen Immunelektrophorese gegen Antispeichelserum stehen dem Ergebnis der Diskoelektrophorese gegenüber. Während die Diskelektrophorese bei Auftrennung von frischen Nativspeichel sehr scharfe, saubere Banden (14 Banden) ergibt, kommen diese Eigenschaften bei Verwendung von Lyophilisaten nicht zur Geltung (12 Banden). Die Proteine im Lyophilisat müssen folglich eine Veränderung ihrer Eigenschaften erfahren, die durch diese empfindliche Nachweismethode enthüllt wird. Die erhöhte Bandenzahl der Diskelektrophorese gegenüber der Immunelektrophorese ist nach einer Arbeit von STEINER und KELLER (1968) (41) zum Großteil darauf zurückzuführen, daß sich Amylase in der Diskelektrophorese in 4-5 Banden auftrennt, dagegen in der eindimensionalen Immunelektrophorese bei Verwendung der nötigen hohen Konzentrationen sich nicht aufspaltet, wie jene anhand isolierter menschlicher Amylase nachweisen konnten. Eine ähnlich gute Auftrennung der Amylasen ist bei Anwendung der empfindlichen zweidimensionalen Methode möglich. Die Amylasen und Isoamylasen lassen sich hier als mehrere übereinandergelagerte Peaks erkennen. Von den im Parotissekret vorhandenen Proteinen wurden von uns durch monospezifische immunologische Überprüfung folgende Proteine eindeutig nachgewiesen:

Albumin, IgA, IgG,

BENNICK und CONELL (1971) (6) wiesen anhand der Immundiffusion eine Reaktion von Parotisspeichel mit Antitransferrin-Serum nach. Bei den von uns eingesetzten Konzentrationen konnten wir eine Reaktion dieser Art nicht feststellen und stimmen hier mit LEVINE überein. Bei Auftrennung von Normal-Humanserum durch eindimensionale Immunelektrophorese und anschließender Diffusion von Parotissekret-Antiserum ließ sich Transferrin nachweisen. Bei Verwendung von Parotissekret ließ sich die Transferrinlinie nicht bei allen Patienten eindeutig aufzeigen. Die Konzentrationen dürften bei den negativen Fällen, falls Transferrin vorhanden war, zu niedrig gewesen sein.

Zusammenfassung:

Menschliches Parotissekret wird teils in Form von Frischspeichel, teils als Lyophilisat vergleichend eindimensional und zweidimensional immunelektrophoretisch gegen Antihumanserum und Parotissekret-Antiserum vom Kaninchen untersucht. Ergänzend dazu werden Immundoppeldiffusionstests gegen monospezifische Antiseren von Humanserumproteinen durchgeführt. Parallel zu den immunologischen Untersuchungen werden die einzelnen Sekretproben zusätzlich diskelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei finden wir bis zu 14 Banden von einzelnen Eiweißfraktionen; immunelektrophoretisch aufgetrennt finden wir eindimensional 10-11 Banden und zweidimensional 10 Peaks bei Diffusion gegen Parotissekret-Antiserum. Die Diskelektrophorese bietet damit die schärfste Auftrennung, ist aber für identifizierende Untersuchungen nicht geeignet.

Bei der eindimensionalen Immunelektrophorese von Parotissekret gegen Antihumanserum sind zwei Banden sichtbar, bei Humanserum gegen Parotissekret-Antiserum fünf Banden. Die zweidimensionale Auftrennung von Sekret gegen Antihumanserum läßt bis zu acht Banden erkennen.

Folgende Serumproteine sind von uns durch immunologische Untersuchungen nachgewiesen:

Präalbumin, Albumin, IgA in der dimeren Secretory-Form, IgG und Transferrin.

Als drüseneigenes Protein läßt sich Amylase in hohen Konzentrationen nachweisen.

Der Gesamtproteingehalt der Sekrete wird durch Bestimmung des Gewichtes der dialysierten Lyophilisate festgestellt.

Abb. 1

Eindimensionale Immunelektrophorese

oben: Normalhumanserum aufgetragen

unten: Parotisspeichel

Antiserum: Antihumanserum v. Kaninchen

Abb. 1a

Eindimensionale Immunelektrophorese

oben: Normalhumanserum aufgetragen

unten: Parotisspeichel

Antiserum: Anti-IgA-Serum v. Kaninchen

Abb. 2

Eindimensionale Immunelektrophorese

Normalhumanserum und Parotisspeichel
aufgetragen

Antiserum: Parotisssekret-Antiserum

verschiedener Kaninchen nach 6-wöchiger
Immunisierung

K134 K187 K187 K1



Abb. 3 Eindimensionale Immunelektrophorese
 oben: Humanserum aufgetragen
 unten: Parotissekret
 Antiserum: Parotissekret-Antiserum nach 6-wöchiger Immunsierung



Abb. 4 Eindimensionale Immunelektrophorese
 oben und unten Parotissekret aufgetragen
 Antiserum: Parotissekret-Antiserum nach 11-wöchiger Immunsierung



Abb. 5 Zweidimensionale Immunelektrophorese
 Parotissekret aufgetragen
 Antiserum: Antihumanserum v.
 Kaninchen



Abb. 5a Zweidimensionale Immunelektrophorese
 Humanserum aufgetragen
 Antiserum: Antihumanserum v.
 Kaninchen

Abb. 6 Zweidimensionale Immunelektrophorese

Parotissekret von vier verschiedenen Versuchspersonen aufgetragenen Antiserum: Antihumanserum v. Kaninchen

Abb. 6a Zweidimensionale Immunelektrophorese

Parotissekret aufgetragenen Antiserum: Anti-IgA-Serum v. Kaninchen

Abb. 7 Zweidimensionale Immunelektrophorese

Parotissekret von einem Patienten Antiserum: Antihumanserum v. Kaninchen

Abb. 8+9

Zweidimensionale
Immunoelektrophorese
Parotissekret
Antiserum: Parotis-
sekret-Antiserum
nach 6-wöchiger
Immunisierung



Abb. 10

Zweidimensionale
Immunoelektrophorese
Parotissekret
Antiserum: Parotis-
sekret-Antiserum
nach 11-wöchiger
Immunisierung



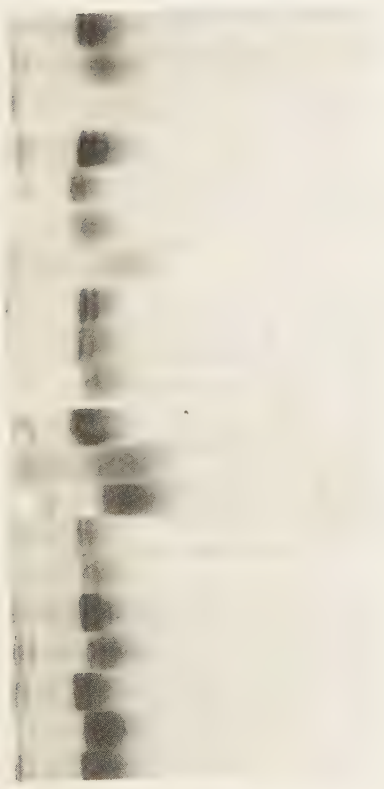


Abb. 11
 Diskelektrophoretische
 Auftrennung von
 Parotismisch- und Einzel-
 sekreteten



Abb. 12
 Ouchterlony-Gegendiffusion
 Parotissekrete gegen Anti-
 IgG-Serum



Abb. 13
 Ouchterlony-Gegendiffusion
 Parotissekrete gegen Anti-
 Albumin-Serum

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ARMSTRONG, W.G. 1971. Characterization studies on the specific human salivary proteins adsorbed in vitro by hydroxyapatite. Caries Res. 5, 215-227
- 2) BALEKJIAN, A.Y., HOERMAN, K.C. and BERZINSKAS, V.J. 1969. Lysozyme of the human parotid secretion: its purification and physiochemical properties. Biochem. biophys. res. Commun. 35, 887-894
- 3) BALEKJIAN, A.Y., LONGTON, R.W. and TOW, H.D. 1972. Isolation of a protamine from human parotid fluid. Intern. Ass. for Dent. Res. Preprinted Abstracts, 50th General Meeting, Abstract 946
- 4) BEHRINGWERKE Laboratoriumsblätter 4 Marburg 1969
- 5) BECKER, W. Methoden der qualitativen und quantitativen Immunelektrophorese Behringwerke AG, Frankfurt 1973
- 6) BENNICK, A. and CONELL, G.E. 1971. Purification and partial characterization of four proteins from human parotid saliva. Biochem. J. 123, 455-464
- 7) BRANDTZAEG, P., 1971. Human secretory immunoglobulins. VII. Concentrations of parotid IgA other secretory proteins in relation to the rate of flow and duration of secretory stimulus. Archs oral. Biol. 16, 1295-1310
- 8) CALDWELL, R.C. and PIGMAN, W., 1965. Discelectrophoresis of human saliva in polyacrylamide gel. Archs Biochem. Biophys. 110, 91-96

- 9) CHAUNCEY, H.H., LIONETTI, F., WINER, R.A. and LISANTI, V.F., 1954. Enzymes of human saliva. I. The determination, distribution and origin of whole saliva enzymes. J. dent. Res. 33, 321-334.
- 10) CHAUNCEY, H.H., LIONETTI, F. and LISANTI, V.F. 1957. Enzymes of human saliva. II. Parotid saliva total esterases. J. dent. Res. 36, 713-716
- 11) CLARKE, M.H.G. and FREEMAN, T. 1968. Quantitative immunelectrophoresis of human serum proteins. Clin. Sci. 35, 403.
- 12) DAWES, C. 1963. Disodium ethylenediaminetetraacetate as an aid for the reconstitution of lyophilized human salivary proteins before paper electrophoresis. Archs oral Biol. 8, 653-656
- 13) DAWES, C. and ONG, B.Y. 1973. Archs oral Biol. 18, 1233.
- 14) D'SILVA, J.L. and FERGUSON, D.B. 1962. Zone electrophoresis of human parotid saliva in various media. Archs oral Biol. 7, 563-571
- 15) ELLISON, S.A. 1966. Salivary antigens J. dent. Res. 45, 644-654
- 16) ENGLHARDT, A. und LOMMEL, H. Serumproteine Band 1 Verlag Chemie, Weinheim 1974.
- 17) FERGUSON, M.H., KRAHN, H.P., HILDES, J.A. 1958. Parotid secretion of protein in man. Can. J. biochem. Physiol. 36, 1001-1008

- 18) GELLER, H.J., HAMES, L., ROVELSTAD, G.H. 1959. Electrophoresis of saliva. J. dent. Res. 38, 854-859
- 19) GIFFORD, G.T. and YUKNIS, L. 1965. Protein patterns in human parotid saliva. J. Chromatogr. 20, 150-153
- 20) GRABAR, P. et WILLIAMS, C.A. 1953. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application du sérum sanguin. Biochim. Biophys. Acta 10, 193
- 21) HUMPHREY, J. H. und WHITE, R. G. Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Georg Thieme Stuttgart 1972
- 22) KAUFFMAN, D. L., ZAGER, N.I., COHEN, E., KELLER, P.J. 1970. The isoenzymes of human parotid saliva. Archs biochem. Biophys. 137, 325-339
- 23) KOHLRAUSCH, F., (1897) Ann. Physik und Chemie 62, 209 zitiert nach 30) Maurer, H.R., Diskelektrophorese
- 24) KÜHN, R.A. Immunoelktrophorese-Fibel. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1974
- 25) LAURELL, C.B. 1965. Antigen-antibody crossed electrophoresis. Anal. Biochem. 10, 358
- 26) LEVINE, M.J. and ELLISON, S.A. 1973. Immunoelctrophoretic and chemical analyses of human parotid saliva. Archs oral Biol. 18, 839-853
- 27) MANDEL, I.D. and ELLISON, S.A. 1961. Characteri-

zation of salivary components separated by paper electrophoresis. Archs. oral Biol. 3, 77-85

- 28) MANDEL, I.D. and ELLISON, S.A. 1965. Organic components of human parotid and submaxillary saliva. Ann. N.Y. Acad. Sci. 131, 802-811
- 29) MASSON, P.L., CARBONARA, A. O. and HEREMANS, J.F. 1965. Studies on the proteins of human saliva. Biochem. Biophys. Acta 107, 485-500
- 30) MAURER, H.R., Diskelektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co. Berlin 1968
- 31) MEYER, T.S. and LAMBERTS, B.L. 1965. Use of coomassie brilliant blue R 250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide gel strips. Biochem. Biophys. Acta 107, 144-145
- 32) MORIYA, H., YAMAZAKI, K. and FUKUSHIMA, H. 1965. Biochemical studies on kallikreins and their related substances. I. Isolation and purification of human saliva kallikrein. J. Biochem. Tokyo 58, 201-209
- 33) OUCHTERLONY, Ö. Gel-diffusion techniques. In: Immunological Methods, by ACKROYD, J. F., Blackwell, Oxford 1964
- 34) PATTON, J. R. and PIGMAN, W. 1959. Electrophoretic and ultracentrifugal components of human salivary secretion. J. Am. chem. Soc. 81, 3035-3039
- 35) RAUCH, S. Die Speicheldrüsen des Menschen. Georg

Thieme Verlag Stuttgart, 1959

- 36) RESSLER, N. 1960. Two-dimensional electrophoresis of serum protein antigens in an antibody containing buffer. Clin. chim. Acta 5, 795
- 37) REVIS, G. J. 1971. Immunelectrophoretic identification of lysozyme in saliva. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 137, 90-96
- 38) SCHEIDEGGER, J.J. 1955. Une microméthode de l'immuno-électrophorese. Int. arch. Allergy 7, 105
- 39) SIMONS, K.T. WEBER, T., STIEL, M. and GRASBECK, R. 1964. Immunelectrophoresis of human saliva. Acta med. scand. Suppl. 412, 257-264
- 40) SKURK, A., MLYNSKI, G., FENDEL, K., 1971 Methoden der quantitativen Eiweißbestimmung im menschlichen Parotisspeichel. Acta Otolaryng. 71, 71
- 41) STEINER, J. C. and KELLER, P.J. 1968. An electrophoretic analysis of the protein components of human parotid saliva. Archs oral Biol. 13, 1213-1221
- 42) STEPHAN und FRAHM 1971. Quantitative Simultan-Immunelektrophorese, Z. klin. Chem. und klin. Biochem. 9, 224-228
- 43) STOFFER, H. R., KRAUS, F.W., HOLMES, A.C. 1962. Immunochemical identification of salivary proteins. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 111, 467-471
- 44) TOMASI, T.B. and ZIGELBAUM, S. 1963. The selective occurrence of IgA-globulins in certain body fluids. J. clin. Invest. 42, 1553-60

- 45) TOMASI, T.B. and BIENENSTOCK, J. 1968.
Secretory immunoglobulins. In: Advances in
Immunology (edited by DIXON, F.J. and KUNKEL,
H.G.) Vol. 9, pp. 2-96. Academic Press, New York.
- 46) VOGT, K. und ZAHL, J. 1973. Arch. klin. exp.
Ohr.-Nas.-und Kehlk.-Heilkunde 203, 310
- 47) WEINSTEIN, E., HESKINS, D., JACKSON, S.W. 1960.
An improved technique for the paper electro-
phoresis of parotid saliva. J. dent. Res. 39,
110-115
- 48) WEISS, I.T. and HABER, N. 1964. Evaluations of
paper electropherograms of parotid saliva. J.
dent. Res. 43, 652-658.
- 49) WOLF, R.O. and Taylor, L. L. 1964. A comparative
study of saliva protein analysis. Archs oral
Biol. 9, 135-140
- 50) WOLF, R.O. and TAYLOR, L. L. 1967. Isoamylase of
human parotid saliva. Nature, Lond. 213, 1128-
1129
- 51) ZIPKIN, I., ADAMIK, E.R., SAROFF, H.A. 1957
Boundary electrophoresis of human parotid saliva.
Proc. Soc. exp. Biol. 95, 69-71
- 52) ZIPPEL, R., MEYER, P., BIETZ, G., 1968. Elektro-
phorese des Parotissekretes. II. Mitteilung:
Membranfolienelektrophorese. Z. Laryngol.
Rhinol. 47, 891.

L E B E N S L A U F

13.3.1950	geboren in München. Tochter des Oberstudiendirektors Erich Hundt und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Oswald.
1956-1960	Besuch der Volksschule an der Gabelsbergerstraße in München.
1960-1969	Besuch des städt. St.-Anna-Gymnasiums München, neusprachlicher Zweig.
Juni 1969	Erlangung des Reifezeugnisses am städt. St.-Anna-Gymnasium.
Oktober 1969	Beginn eines naturwissenschaftlichen Studiums an der Ludwigs-Maximilians-Universität München.
April 1970	Zulassung zum Studium der Zahnmedizin an der Universität München.
24.7.1975	Approbation als Zahnärztin.
15.9.1975 - auf weiteres Ausbildungs- ziel:	Tätigkeit als Ausbildungsassistentenzahnärztin.
24.2.1976	Fachzahnärztin für Kieferorthopädie. Rigorosum

